mNGS 技术、G 试验在判断肺孢子菌感染与定植中的价值及二者相关性

10.12114/j.issn.1007-9572.2022.0594

张彩霞，刘新年，杜川，王新卫*

430033 湖北省武汉市，江汉大学附属湖北省第三人民医院呼吸内科

*通信作者：王新卫，主任医师；E-mail：3281490562@qq.com

【摘要】背景 mNGS技术具有广覆盖、迅速高敏、无偏移性特点，已被广泛应用于疑难、危重、特殊病原体检测，尽管其应用前景广阔，但仍存在无法明确背景菌、污染菌、定植菌、致病菌等情况，目前鲜有文章通过mNGS检出耶氏肺孢子菌（PJ）序列判断其定植与感染的截断值。**目的** 探讨肺泡灌洗液mNGS技术、血清G试验在判断PJ感染与定植中的价值及二者之间相关性。**方法** 搜集2018年9月至2022年5月湖北省第三人民医院收治住院治疗，且行肺泡灌洗液mNGS技术检出PJ序列数的40例肺部感染患者病例资料进行回顾性分析。根据mNGS检出PJ是否抗PJ治疗分为两组：PJ感染组21例，PJ定植组19例。观察两组临床特点、血清G试验、mNGS序列数之间的差异，同时分析血清G试验、mNGS序列数在判断PJ感染与定植中的价值，求得截断值，比较二者的相关性。**结果** 两组一般资料、基础疾病、临床症状之间比较差异均无统计学意义（P>0.05），PJ感染组较定植组更多存在糖皮质激素或免疫抑制剂使用，差异有统计学意义（P＜0.05）；两组影像学特点如实变、结节、胸腔积液、囊状改变之间比较差异均无统计学意义（P>0.05），PJ感染组磨玻璃渗出影、间质改变明显多于定植组，差异有统计学意义（P＜0.05）；两组实验室检查中血白细胞数、中性粒细胞数、淋巴细胞数、PCT、CRP、LDH、PaO2/FiO2之间比较差异均无统计学意义（P>0.05），PJ感染组$CD4^{+}$T细胞数明显低于定植组，而血G试验、mNGS序列数明显高于定植组，差异均有统计学意义（P＜0.05）；ROC曲线示mNGS序列数与血G试验鉴别感染与定植的最佳阈值分别为24个、106.7pg/ml，AUC值分别为0.95、0.89，敏感度分别为95.2%、76.2%，特异度分别为78.9%、89.5%。Spearman相关性结果示mNGS序列数与血G试验水平呈正相关（R=0.769、P＜0.001）。**结论** 结合存在免疫缺陷，尤其糖皮质激素或免疫抑制剂使用，影像学表现为典型磨玻璃渗出影及间质改变，外周血$CD4^{+}$T细胞数下降，尤其<200个/ul，如血G试验及mNGS检出PJ序列数明显升高，分别≥106.7pg/ml、24个时，有助于PJ感染的诊断。

【关键词】肺泡灌洗液 mNGS 技术；血清 G 试验；耶氏肺孢子菌；感染；定植；价值

【中图分类号】R 563.1

The values of mNGS and G test in judging infection or colonization of pneumocystis and their correlation ZHANG Caixia,LIU Xinnian,DU Chuan，WANG Xinwei*

Department of Respiratory Medicine, Hubei NO.3 people's hospital of jianghan university, Wuhan 430033, China.

*Corresponding author: WANG Xinwei, Chief physician; E-mail: 3281490562@qq.com

【Abstract】**Background** MNGS technology has been widely used in the detection of difficult,critical and special pathogens due to its wide coverage, rapid, high sensitivity and no deviation.Although it has a broad application prospect,there are still some problems that background bacteria,contaminating bacteria,colonizing bacteria and pathogenic bacteria cannot be clearly defined.At present,there are few papers to judge the cut-off value between colonization and infection of pneumocystis jiroveci(PJ) sequence detected by mNGS.**Objective** To investigate the values of alveolar lavage fluid mNGS technique and serum G test in judging infection or colonization of PJ and their correlation.**Methods** The data of 40 patients with pulmonary infection in Hubei NO.3 people's hospital from September 2018 to May 2022 whose PJ sequence numbers were detected by alveolar lavage fluid mNGS technology were collected and analyzed retrospectively.They were divided into two groups according to whether to anti-PJ treatment:PJ infection group (n=21) and colonization group(n=19).The clinical characteristics,serum G test and mNGS sequence between the two groups were observed.The values of serum G test and mNGS sequence in judging PJ infection or colonization were analyzed,the cut-off value was obtained, and the correlation was compared.**Results** There were no significant differences between the two groups in general information,basic diseases and clinical symptoms($P>0.05$).The use of glucocorticoids or immunosuppressants was more prevalent in the PJ infection group than the colonization group,the difference was statistically significant ($P<0.05$).There were no significant differences between the two groups in imaging characteristics such as consolidation,nodules,pleural effusion and cystic changes ($P>0.05$).The changes of ground glass exudate shadow and interstitial in PJ infection group were significantly more than the colonization group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$).There were no significant differences between the two groups in the number of blood white cells,neutrophils,lymphocytes,PCT,CRP, LDH and PaO_2/FiO_2($P>0.05$).The number of $CD4^+$T cells in the PJ infection group was significantly lower than the colonization group, while serum G test and mNGS sequence were significantly higher than the colonization group,the differences were statistically significant($P<0.05$).ROC curve showed that the best thresholds for mNGS sequence and serum G test to distinguish infection or colonization were 24 and 106.7pg/ml,AUC

values were 0.95 and 0.89,sensitivity were 95.2% and 76.2%, specificity were 78.9% and 89.5%,respectively.Spearman's correlation result showed that mNGS sequence was positively correlated with serum G test(R=0.769,P <0.001).**Conclusion** Combined with immunodeficiency,especially the use of glucocorticoids or immunosuppressants,imaging findings show typical ground-glass exudation and interstitial changes,and the number of peripheral blood CD4+T cells decreases,especially<200/ul.If blood G test and PJ sequences detected by mNGS increase significantly,≥106.7pg/ml and 24,respectively.It is helpful for the diagnosis of PJ infection.

【Keywords】mNGS technique of alveolar lavage fluid；Serum G test；Pneumocystis jiroveci；Infection；Colonization；Value

耶氏肺孢子菌肺炎（Pneumocystis jiroveci pneumonia，PJP）是由耶氏肺孢子菌（Pneumocystis jiroveci，PJ）引起的人类呼吸系统机会性感染，多发生于免疫功能低下者。由于PJ不能在体外培养基生长，故目前确诊PJP仍是靠下呼吸道标本通过染色镜检发现特征性的包囊或滋养体为主，但传统的染色方法敏感度不高，使得大部分PJP患者不能得以准确、快速确诊[1]。因此，还需结合临床表现以及其他检测方法。尽管多项研究显示血清1，3－β－D葡聚糖（G）试验[2、3]可辅助诊断PJP，但由于1，3－β－D葡聚糖也存在于其他真菌，并非PJ特异性标志物，故其价值有限。近来，随着宏基因组二代测序（metagenomic next generation sequencing，mNGS）技术兴起，由于该技术具有广覆盖、迅速高敏、无偏移性特点，已被广泛应用于疑难、危重、特殊病原体检测[4-6]，故而使得越来越多PJP患者得以发现。尽管mNGS应用前景广阔，但仍存在无法明确背景菌、污染菌、定植菌、致病菌等情况，尤其PJ可以共生或以正常菌群的形式定植于人体呼吸道，故当mNGS检出PJ序列时，那么其是定植还是感染呢，其有无合适的截断值予以判断呢。本研究拟通过比较PJ感染者与定植者间临床特点、血清G试验、肺泡灌洗液mNGS序列数的差异，从而探讨肺泡灌洗液mNGS技术、血清G试验在判断PJ感染与定植中的价值及二者相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

搜集2018年9月至2022年5月湖北省第三人民医院收治住院治疗，且行肺泡灌洗液mNGS技术检出PJ序列数的40例肺部感染患者病例资料进行回顾性分析。根据mNGS检出PJ是否抗PJ治疗分为两组：PJ感染组（mNGS检出PJ，抗PJ治疗有效者）21例，PJ定植组（mNGS检出PJ，未抗PJ治疗好转出院者）19例。PJP纳入标准：(1)临床表现为咳嗽、发热、呼吸困难、进行性缺氧等；(2)影像学表现为多发性结节、多发斑片影或实变影、磨玻璃样改变或肺间质弥漫浸润病变等；(3)mNGS检出PJ序列；（4）由两位及以上具有高级职称且经验丰富医生共同诊断。（5）抗PJ治疗有效。两组排除标准：(1)年龄<18岁；(2)无肺部感染及病原学证据；(3)mNGS前行经验性抗PJ治疗者。（4）肺部真菌感染者，严重心脏疾病及严重心律失常者，

近 1 月发生心脑血管事件者，严重精神心理性疾病及无行为能力不能配合完成肺泡灌洗液 mNGS 检查者等。（5）临床资料不完整。（6）后期随访不符合诊断者。

1.2 方法

1.2.1 一般标本采集

所有患者入院完善血常规，血生化，血 LDH 及 CRP、PCT、(1，3)-β-D 葡聚糖检测(G 试验)、半乳甘露聚糖检测(GM 试验)，血气分析，痰涂片、痰培养，胸部 CT 等检查。

1.2.2 支气管肺泡灌洗液采集：所有患者均签署知情同意书，禁水、禁食 4 h，2% 利多卡因喷雾局麻咽部和鼻腔后，在 olympusBF-260 型电子支气管镜下采集支气管肺泡灌洗液，按《肺部感染性疾病支气管肺泡灌洗病原体检测中国专家共识(2017 年版)》[7]进行操作，严格遵守无菌原则，灌洗部位根据胸部影像学确定，病变局限者选择病变段，弥漫性病变者选择右肺中叶或左肺上叶舌段。当支气管镜到达目标支气管段或亚段后，将顶端嵌顿在入口处，经操作孔道快速注入 37℃生理盐水，总量 60～120ml，分次注入(每次 20～50 ml)，注入后立即以 100mmHg 负压抽吸，回收率 40%～60%，回收的灌洗液装入灭菌容器中，一份（≥10ml）送检常规微生物检查，一份（≥5ml）行 mNGS 检测。

1.2.3 mNGS 检测方法

采取合格样本后，干冰保存送至深圳华大基因（mNGS 标本的采集、保存和运输严格按照该公司标准化规范执行）行 mNGS 检测，对样本中微生物核酸序列进行分析，与该公司病原数据库进行比对，得出报告结果序列数，从而对微生物进行鉴定。检测过程包括：核酸提取、RNA 逆转录、目标片段化、文库构建、上机测序（测序下机后去除低质量和长度小于 35bp 的数据以获得高质量的数据）、生物信息分析、报告解读等。

1.3 统计学方法：采用 spss22.0 统计软件分析，正态分布数据以均数士标准差（$\bar{x}$ 士 s）描述，组间比较采用 t 检验；非正态分布数据以中位数（四分位间距）［M（P25,P75）］描述，采用 Mann-whitneyU 检验进行组间比较；计数资料以例表示，组间比较采用 x^2 检验、校正 x^2 检验或 Fisher 精确概率法；采用受试者工作特征曲线（receiver operating characteristic curve，ROC）分析 mNGS 与血 G 试验判断 PJ 感染与定植价值，计算曲线下面积（area under the curve，AUC），求得截断值。采用 Spearman 相关分析 mNGS 与血 G 试验相关性。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料、基础疾病、用药史比较：PJ 感染组与定植组在年龄、性别、BMI、吸烟史、基础疾病之间比较差异均无统计学意义（P>0.05，表 1），但 PJ 感染组较定植组更多存在糖皮质激素或免疫抑制剂使用，差异有统计学意义（P＜0.05，表 1）。

表 1 两组患者一般资料、基础疾病及用药史比较

Table 1 Comparison of general information, underlying diseases and medication history between the two groups

组别	例数	性别[女（%）]	年龄（岁，$\bar{x}\pm s$）	BMI（kg/m^2，$\bar{x}\pm s$）	吸烟史[n（%）]
PJ 感染组	21 例	6（28.57）	62±17.07	20.92±2.79	16(76.19)
PJ 定植组	19 例	10(52.63)	67.68±11.69	20.84±2.26	14(73.68)
x^2（t）值		2.406[a]	2.997	1.747	0.000[a]
P 值		0.121	0.092	0.194	1.000

组别	例数	慢性肾脏疾病[n(%)]	血液系统疾病[n(%)]	自身免疫性疾病[n(%)]	恶性肿瘤[n(%)]
PJ 感染组	21 例	4(19.05)	2(9.52)	2(9.52)	5(23.81)
PJ 定植组	19 例	4(21.05)	1(5.26)	2(10.53)	4(21.05)
x^2值		-	-	-	-
P 值		1.000	1.000	1.000	1.000

组别	例数	HIV[n(%)]	实体器官移植[n(%)]	慢性肺部疾病[n(%)]	糖皮质激素/免疫抑制剂[n(%)]
PJ 感染组	21 例	1(4.76)	2(9.52)	2(9.52)	11(52.38)
PJ 定植组	19 例	0(0)	1(5.26)	5(26.32)	1(5.26)
x^2值		-	-	-	10.545
P 值		1.000	1.000	0.226	0.001

注：BMI=体质量指数，HIV=获得性免疫缺陷综合征，-为 Fisher 精确概率法，[a] 为 x^2值

2.2 临床症状及影像学特点比较：PJ 感染组与定植组在临床症状如发热、咳嗽、咳痰、呼吸困难、胸痛、咯血等症状间比较差异无统计学意义（P>0.05，表 2）。两组影像学特点比较中，PJ 感染组磨玻璃渗出影、间质改变明显多于定植组，差异有统计学意义（P<0.05，表 2），但两组影像学特点如实变、结节、胸腔积液、囊状改变间比较差异无统计学意义（P>0.05，表 2）。

表 2 两组患者临床症状及影像学特点比较

Table 2 Comparison of clinical symptoms and imaging characteristics between the two groups

组别	例数	发热[n(%)]	咳嗽[n(%)]	咳痰[n(%)]	呼吸困难[n(%)]	胸痛[n(%)]	咯血[n(%)]
PJ 感染组	21 例	14(66.67)	17(80.95)	10(47.62)	17(80.95)	2(9.52)	1(4.76)
PJ 定植组	19 例	16(84.21)	17(89.47)	13(68.42)	14(73.68)	3(15.79)	2(10.53)
x^2值		0.835	-	1.766	-	-	-

P 值	0.361	0.664	0.184	0.712	0.654	0.596

组别	例数	磨玻璃影[n（%）]	间质改变[n（%）]	实变[n（%）]	结节[n（%）]	胸腔积液[n（%）]	囊状[n（%）]
PJ 感染组	21 例	15(71.43)	13(61.90)	9(42.86)	3(14.29)	2(9.52)	1(4.76)
PJ 定植组	19 例	1(5.26)	2(10.53)	11(57.89)	6(31.58)	3(15.79)	2(10.53)
x^2 值		18.195	11.235	0.902	-	-	-
P 值		<0.001	0.001	0.342	0.265	0.654	0.596

注：-为Fisher精确概率法

2.3 实验室指标比较：PJ 感染组与定植组血白细胞数、中性粒细胞数、淋巴细胞数、PCT、CRP、LDH、Pa02/Fi02 间比较差异无统计学差异（P>0.05，表 3）。PJ 感染组 $CD4^+T$ 细胞数明显低于定植组，而血 G 试验、mNGS 序列数明显高于定植组，差异均有统计学意义（P<0.05，表 3）。

表 3　两组实验室指标比较

Table 3 Comparison of laboratory indicators between two groups

组别	例数	WBC（$\times10^9$/L，$\bar{x}\pm s$）	Neu（$\times10^9$/L，$\bar{x}\pm s$）	Lym {$\times10^9$/L，[M(P25,P75)]}	PCT {ng/ml，[M(P25,P75)]}
PJ 感染组	21 例	9.32±4.33	7.13±3.55	0.9[0.2,1.3]	0.33[0.23,0.45]
PJ 定植组	19 例	8.03±3.45	5.09±2.92	0.7[0.11,1.36]	0.3[0.25,0.36]
Z（t）值		2.007	1.533	-0.421[a]	-0.841[a]
P 值		0.165	0.223	0.674	0.400

组别	例数	$CD4^+T$ 细胞数 {个/ul，[M（P25,P75）]}	血 G 试验 {pg/ml，[M（P25,P75）]}	mNGS 序列数 {个，[M（P25,P75）]}

组别	例数	CRP {mg/L，[M（P25,P75）]}	LDH {U/L，[M（P25,P75）]}	Pa02/Fi02 {mmHg，[M（P25,P75）]}
PJ 感染组	21 例	55[16.05,104.1]	441 [242,723]	310 [229,362]
PJ 定植组	19 例	54[26.1,95.0]	359 [260,554]	323 [210,379]
Z 值		-0.298	-0.528	-0.704
P 值		0.766	0.597	0.481

PJ 感染组 21 例	77 [34.5,131]	193.2[104.7,1137.3]	520[31,4583]
PJ 定植组 19 例	258[226,325]	80.9[52，102.7]	10[5,23]
Z 值	-5.134	-4.212	-4.810
P 值	＜0.001	＜0.001	＜0.001

注：WBC=白细胞数，Neu=中性粒细胞数，Lym=淋巴细胞数，PCT=降钙素原，CRP=C 反应蛋白，LDH=乳酸脱氢酶，PaO2/FiO2=动脉血氧分压/吸入氧浓度百分比，[a] 为 Z 值

2.4 mNGS 序列数与血 G 试验鉴别 PJ 感染与定植价值：以临床最终诊断 PJP 感染与定植为金标准时，mNGS 序列数与血 G 试验鉴别感染与定植的最佳阈值分别为 24 个、106.7 pg/ml。AUC 值分别为 0.95、0.89，敏感度分别为 95.2%、76.2%，特异度分别为 78.9%、89.5%（图 1、表 4）。

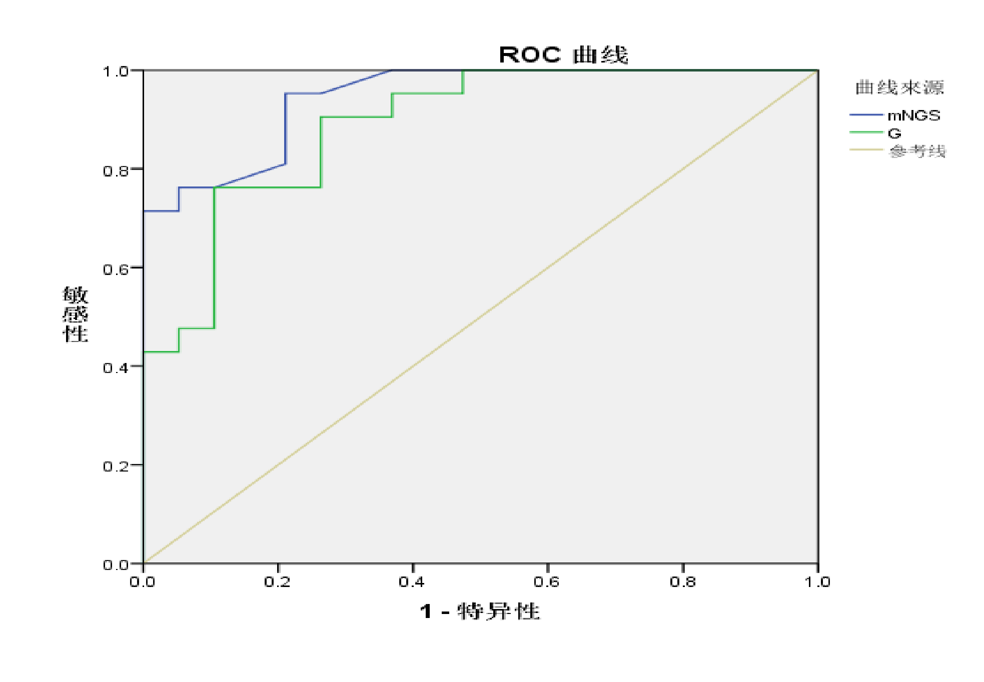


图 1：mNGS 序列数与血 G 试验鉴别感染与定植 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve of mNGS sequence number and blood G test in differentiating infection from colonization

表 4 mNGS 序列数与血 G 试验鉴别 PJ 感染与定植价值

Table 4 Value of mNGS sequence number and blood G test in differentiating PJ infection from colonization

指标	AUC	95% CI	P 值	截断值	敏感度（%）	特异（%）度
mNGS	0.95	0.88-1.00	＜0.001	24 个	95.2	78.9

2.	血 G 试验	0.89	0.79-0.99	＜0.001	106.7pg/ml	76.2	89.5

5 血 G

试验与 mNGS 序列数相关性分析：Spearman 相关性结果示 mNGS 检出 PJ 序列数与血 G 试验水平呈正相关，R=0.769, P＜0.001（图 2）。

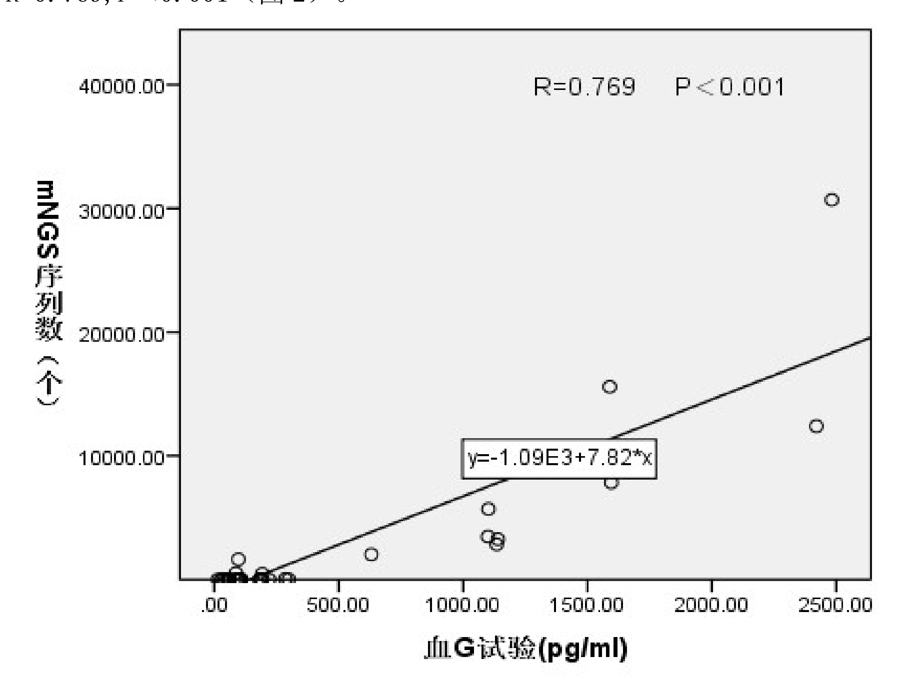


图 2：mNGS 检出 PJ 序列数与血 G 试验相关性

Figure 2 Correlation between the number of PJ sequences detected by mNGS and blood G test

3 讨论

随着医学技术的快速发展，mNGS 技术已广泛应用于感染性疾病的诊断[8-10]，PJP 的诊断在一定程度上得以改善，但有学者发现 PJ 定植相当普遍[11、12]，因此，如何监测 PJ 的感染与定植是当前的一项重要课题。本研究拟通过比较 PJ 感染与定植不同之处，为临床鉴定感染与定植提供依据。

在一般资料、基础疾病、用药史方面，本研究发现19例PJ定植组和21例PJ感染组绝大多数来自于免疫缺陷患者如艾滋病、血液系统疾病、恶性肿瘤、器官移植、自身免疫性疾病、长期使用糖皮质激素或免疫抑制剂者等，部分来自于慢性肺部疾病，另外定植组尚可见于免疫功能正常人群。因此，肺孢子菌的感染或定植除需重点关注免疫抑制个体人群外，尚需关注慢性肺部疾病，Babic-Erceg A[13]及Lowe DM[14]的研究亦提示肺孢子菌的感染或定植与慢性阻塞性肺疾病、肺囊性纤维化以及间质性肺炎等多种呼吸系统疾病密切相关。可见，慢性肺部疾病在PJ感染或定植中亦扮演一定角色。同时，本研究发现PJ感染组约52.4%患者接受过糖皮质激素或免疫抑制剂治疗，而PJ定植组19例中仅有1例使用过糖皮质激素或免疫抑制剂，提示长期应用此类药物是PJ感染高危因素。因此，当存在上述基础疾病、尤其接受糖皮质激素或免疫抑制剂治疗的患者中，我们应该警惕PJP感染的发生，PJ定植除在免疫缺陷患者中可见外，尚可见于免疫功能正常人

群中。

在临床表现方面，本研究发现PJ感染组与定植组在临床症状如发热、咳嗽、咳痰、呼吸困难、胸痛、咯血等症状间并无明显差异。提示，通过临床症状无法区分二者。近年来，临床上常用肺部影像学改变、血液中CD4$^+$T细胞数、G试验、LDH等[15、16]指标辅助诊断或预测PJP。本研究应用于鉴别PJ感染与定植中，发现PJ感染组较定植组更多可见典型磨玻璃渗出影、间质改变，但两组影像学特点如实变、结节、胸腔积液、囊状改变间比较无统计学差异。同时，本研究中两组血LDH并无差异性，提示靠血LDH无法鉴别定植与感染，但血G试验，PJ感染组明显高于定植组，与Liu L等[17]研究一致。另本研究发现PJ感染组CD4$^+$T细胞数明显低于定植组，几乎所有PJP患者的外周血CD4$^+$T细胞数<200个/ul，而且发现此部分患者mNGS检出PJ序列数明显高于定植组。因此，对于某些免疫功能低下患者，在治疗过程中需密切监测CD4$^+$T细胞数，一旦CD4$^+$T细胞数呈下降趋势时，需警惕PJP感染，此时可结合影像学、血清G试验、mNGS检查来判断。

综上，考虑鉴别 PJ 感染与定植的模型可能包含：1）免疫缺陷，尤其糖皮质激素或免疫抑制剂使用；2）影像学表现为典型磨玻璃渗出影、间质改变；3）外周血 CD4$^+$T 细胞数降低，尤其<200 个/ul；4）血 G 试验升高；5）mNGS 检出 PJ 序列数。

鉴于多项研究[18-20]显示 G 试验对于诊断 PJP 以及判断治疗效果有一定的价值，且数值的高低可鉴别肺孢子菌的定植和感染，数值越高，感染可能性越大，但鉴别二者的临界值如何呢。而 Damiani C 等[21]人发现，实时荧光定量 PCR 可以根据 PJ 拷贝数不同来区分 PJ 感染或定植，但是拷贝数的临界值很难确定。基于此，是否可以根据 mNGS 检出 PJ 序列数来区分 PJ 感染和定植呢，其鉴别二者的临界值又如何呢。本研究以临床最终诊断 PJP 感染与定植为金标准时，发现 mNGS 序列数与血 G 试验鉴别感染与定植的最佳阈值分别为 24 个、106.7pg/ml。AUC 值分别为 0.95、0.89，敏感度分别为 95.2%、76.2%，特异度分别为 78.9%、89.5%。同时，既往多项研究表示血清 G 试验能用于评估 PJ 负荷，Jiang J 等[22]的研究认为血清 G 试验与 PJ 负荷正相关。但 Held[23] 和 Liu L[17]等的研究却认为血清 G 试验与 PJ 负荷并不相关。本研究亦对其相关性进行了分析，发现 mNGS 检出 PJ 序列数与血 G 试验水平呈正相关，与 Jiang J 等[22]研究一致。因此，血 G 试验与 mNGS 除可以辅助诊断 PJP 外，尚可将 PJ 感染与定植区分开来，当血 G 试验水平≥106.7pg/ml、mNGS 检出 PJ 序列数≥24 个时，诊断 PJ 感染价值较大，mNGS 检出 PJ 序列数与血 G 试验水平正相关。

本研究虽为如何区分 PJ 感染与定植作出了阐述，但亦存在一定局限性：1）mNGS 报告的解读，尚无统一标准，尽管本研究尝试了判断 PJ 感染与定植的 mNGS 序列数截断值，但由于受样本量小局限，今后需扩大样本量多中心前瞻性研究进一步验证。2）对于判断 PJ 感染与定植，无标准的诊断参数，本研究以是否抗 PJP 治疗有效且经随访确认，故可能存在一定选择偏倚。今后研究方向：扩大样本进一步研究，同时动态监测血 G 试验与 mNGS 中 PJ 序列数变化，了解其对评估治疗疗效有无价值。

参考文献

[1] Esteves F, Medrano FJ, DeArmas Y, etal. Pneumocystis and Pneumocystosis: first meeting of experts from Latin-American and Portuguese-speaking countries a mini-review[J].Expert Rev Anti Infect Ther, 2014, 12(5): 545-548.DOI: 10.1586/14787210.2014.894883.

[2]Esteves F, Cale SS, Badura R, et al. Diagnosis of Pneumocystis pneumonia: evaluation of four serologic hiomarkers[J].Clin Microbiol Infect, 2015, 21(4): 379.el-10.DOI:10.1016/j.cmi.2014.11.025.

[3] 李茜茜，叶宁，朱明利，等.1-3-β-D葡聚糖检测在艾滋病相关肺孢子菌肺炎诊断中的价值[J].中华医院感染学杂志，2018，28（2）：161-164. DOI:10.11816/cn.ni.2017-171269.LI X X,YE N,ZHU M L,et al.Value of 1-3-β-D glucan in diagnosis of AIDS-related Pneumocystis pneumonia[J].Chinese Journal of Nosocomiology,2018，28（2）：161-164.DOI:10.11816/cn.ni.2017-171269.

[4] Miao Q, Ma YY, Wang QQ, etal. Microbiological diagnostic performance of metagenomic next-generation sequencing when applied to clinical practice[J].Clin Infect Dis,2018,67(suppl2): s231-s240.DOI:10.1093/cid/ciy693.

[5] Wu X,Li Y,Zhang M,etal.Etiology of severe community-acquired pneumonia in adults based on metagenomic next-generation sequencing:a prospective multicenter study[J].Infect Dis Ther, 2020, 9(4):1003-1015.DOI:10.1007/s40121-020-00353-y.

[6] 宏基因组分析和诊断技术在急危重症感染应用专家共识组.宏基因组分析和诊断技术在急危重症感染应用的专家共识[J].中华急诊医学杂志，2019,28（2）:151-155.DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2019.02.005.The expert consensus group of metagenomic analysis and diagnostic techniques in the application of acute and severe infections.Expert consensus on the application of metagenomic analysis and diagnostic techniques in acute and severe infections[J].Chinese Journal of Emergency Medicine，2019,28（2）:151-155.DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2019.02.005.

[7] 中华医学会呼吸病学分会.肺部感染性疾病支气管肺泡灌洗病原体检测中国专家共识(2017年版)[J].中华结核和呼吸杂志,2017,40(8):578-583.DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2017.08.007.Chinese Society of Respiratory Medicine.Chinese Expert Consensus on the detection of bronchoalveolar lavage pathogens in Pulmonary Infectious Diseases (2017 edition)[J].Chin J Tuberc Respir Dis, 2017,40(8):578-583.DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2017.08.007.

[8] Deurenbe RH, Bathoorn E, chlebowicz MA, eta1.Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention[J]. J Biotechnol, 2017, 243: 16—24. DOI:10.1016/j.jbiotec.

[9] 张敏，李伯安，邱广斌. 下一代测序技术在感染性疾病检测上的临床应用[J]. 中华检验医学杂志，2017，40(7)：492-494. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2017.07.004.ZHANG M,LI B A,QIU G B.Application of next generation sequencing technology in clinical diagnosis of infectious disease[J].Chinese Journal of Laboratory Medicine,2017，40(7)：492-494. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2017.07.004

[10] Rossen JWA,Friedrich AW,Moran-Gilad J,eta1.Practical issues in implementing whole-genome-sequencing in routine diagnostic microbiology[J].Clin Microbiol Infect，2018，24(4):355 - 360.DOI:10.1016/j.cmi.

[11]Ma L,Cisse OH,Kovacs JA.A molecular window into the biology and epidemiology of pneumocystis spp[J].Clin Microbiol Rev，2018，31(3)：e00009-18. DOI:10.1128/CMR.00009-18.

[12]Morris A,Norris KA.Colonization by pneumocystis jirovecii and its role in disease[J].Clin Microbiol Rev，2012，25（2）：297-317.DOI:10.1128/CMR.00013-12.

[13]Babic-Erceg A，Vilibic-Cavlek T，Erceg M，eta1.Prevalence of:pneumocystis jirovecii pneumonia(2010-2013)：The first Croatian report[J]. Acta Microbiol Immunol Hung，2014，61(2)：181-188.DOI:10.1556/AMicr.61.2014.2.8.

[14]Lowe DM,Rangaka MX,Gordon F,eta1.Pneumocystis jirovecii pneumonia in tropical and low and middle income countries：a systematic review and meta-regression[J].PLoS One,2013,8(8):e69969. DOI:10.1371/journal.pone.0069969.

[15]Swain SD，Siemsen DW，Pullen RR，eta1.CD4^{+}T cells and IFN-γ are required for the development of Pneumocystis associated pulmonary hypertension[J]. AmJ Pathol，2014，184(2)：483-493.DOI:10.1016/j.ajpath.2013.10.027.

[16]Riebold D，Enoh DO，Kinge TN，eta1.Pneumocystis jirovecii colonisation in HIV-positive and HIV-negative subjects in Cameroon[J].Trop Med Int Health，2014，19(6)：643-655.DOI:10.1111/tmi.12299.

[17] Liu L,Yuan MJ,Shi Y，eta1. Clinical performance of BAL metagenomic next-generation sequence and serum(1,3)-β-D-glucan for differential diagnosis of pneumocystis jirovecii pneumonia and

pneumocystis jirovecii colonisation[J].Front Cell Infect Microbiol，2021，11:784236.DOI:10.3389/fcimb.2021.784236.

[18]SongY，RenY，WangX，etal. Recent advances in the diagnosis of pneumocystis pneumonia[J]. Med Mycol J，2016，57（4）：E111-E116.DOI:10.3314/mmj.16-00019.

[19]White PL，Price JS，Posso RB，etal. An evaluation of the performance of the dynamiker(R)Fungus(1，3)-β-D-glucan assay to assist in the diagnosis of invasive aspergillosis，invasive candidiasis and pneumocystis pneumonia[J]. Med Mycol，2017，55（8）：843—850.DOI:10.1093/mmy/myx004.

[20] Tasaka S，Kobayashi S，Yagi K，etal. Serum(1，3)-β-D-glucan assay for discrimination between Pneumocystis jirovecii pneumonia and colonization[J]. J Infect Chemother，2014，20(11):678-681.DOI:10.1016/j.jiac.2014.07.001.

[21] Damiani C，LeGal S，DaCosta C，etal. Combined quantification of pulmonary pneumocystis jirovecii DNA and serum(1，3)-β-D-glucan for differential diagnosis of pneumocystis pneumonia and pneumocystis colonization [J] . J Clin Microbiol，2013,51（10）:3380-3388.DOI:10.1128/JCM.01554-13.

[22] Jiang J,Bai L,Yang W,etal.Metagenomic next-generation sequencing for the diagnosis of pneumocystis jirovecii pneumonia in non-HIV-infected patients:a retrospective study [J] .Infect Dis Ther，2021，10(3):1733-1745. DOI:10.1007/s40121-021-00482-y

[23] Held J,Koch MS,Reischl U,etal.Serum(1，3)-β-D-glucan measurement as an early indicator of pneumocystis jirovecii pneumonia and evaluation of its prognostic value [J] .Clin Microbiol Infect，2011，17（4）：595-602. DOI:10.1111/j.1469-0691.2010.03318.x.